

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
31. Mai 2001 (31.05.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/37889 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61L 24/00**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/11716

(22) Internationales Anmeldedatum:  
24. November 2000 (24.11.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 56 503.1 24. November 1999 (24.11.1999) DE

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG** [DE/DE]; Hugstetter Str. 49, 79106 Freiburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **SCHAEFER, Dirk, Johannes** [DE/DE]; Maltererstrasse 8, 79102 Freiburg (DE). **KIEFER, Thomas** [DE/DE]; Littenweilerstr. 36b, 79117 Freiburg (DE). **STARK, Gerhard, Björn** [DE/DE]; Am Rossberg 25, 79874 Breitnau (DE). **KNESER, Ulrich** [DE/DE]; Fehrenbachallee 1-3, 79106 Freiburg (DE).

(74) Anwalt: **LEDERER, KELLER & RIEDERER**; Prinzregentenstrasse 16, 80538 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zwei-Buchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: INJECTABLE BONE-SUBSTITUTE MATERIAL

**A2** (54) Bezeichnung: SPRITZBARES KNOCHENERSATZMATERIAL

(57) **Abstract:** The invention relates to a bone-substitute material, comprising a soft matrix, living cells and a curing matrix. The invention also relates to methods for producing a bone-substitute material of this type and to the use of non-ceramic hydroxyapatite cement for producing a bone-substitute material containing cells. Said bone-substitute material can be injected in a minimally-invasive manner into a bone-defect, using an injection device which is appropriate to the invention.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Knochenersatzmaterial, das eine weiche Matrix, lebende Zellen und eine austrocknende Matrix umfasst. Die Erfindung betrifft auch Verfahren zur Herstellung eines derartigen Knochenersatzmaterials und die Verwendung von nicht-keramischem Hydroxylapatit-Zement zur Herstellung eines Zellen enthaltenden Knochenersatzmaterials. Dieses kann in einem die Erfindung betreffenden geeigneten Spritzapparat minimal-invasiv in einen Knochendefekt injiziert werden.

**WO 01/37889**

### Spritzbares Knochenersatzmaterial

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Knochenersatzmaterial enthaltend lebende Zellen und eine aushärtende Matrix. Die Erfindung betrifft ebenfalls Verfahren zur Herstellung eines derartigen Knochenersatzmaterials sowie die Verwendung von Hydroxylapatit-Zement zur Herstellung eines lebende Zellen enthaltenden Knochenersatzmaterials und deren Anwendung in einem geeigneten Spritzapparat.

Bei zahlreichen Knochendefekten ist es wünschenswert, ein Knochenersatzmaterial zur Verfügung zu haben, mit dem diese Defekte aufgefüllt werden können. Beispiele für derartige Defekte sind im Kieferbereich Parodontose oder Atrophien, im Handbereich Defekte nach Knochentumorresektionen und Traumata und Defekte der Wirbelsäule, des Schädels und der Röhrenknochen, beispielsweise bei Osteoporosefrakturen und Tumorresektionen.

Im Stand der Technik sind verschiedene Knochenersatzmaterialien bekannt. Knochenersatzmaterialien, die verformt werden können, werden oft als "injizierbarer Knochen" bezeichnet. Bisherige Lösungen unter diesem Begriff beinhalten entweder Hydrogele mit knochenbildenden Zellen, Hydrogele mit osteoinduktiven Proteinen oder Polymere, die sich *in situ* verfestigen, mit oder ohne osteoinduktiven Faktoren. Jede dieser Lösungen hat spezifische Nachteile.

Entweder enthalten die Materialien keine knochenbildenden Zellen, sie können also nicht osteogen wirken. In der Regel wird ein Biomaterial oder Knochenzement als homogene Plombe in einen Knochendefekt gespritzt, die nicht mehr resorbierbar und durch Knochen ersetzbar ist. Unter mechanischen Belastungen kommt es zur Ermüdung und zum Bruch des Implantats.

Materialien, die Zellen enthalten, weisen zwar potentielle Osteogenität auf, besitzen aber keine Stabilität. Diese Materialien, meist in Form von Hydrogelen, können auch nicht geformt werden und haben keine Plastizität. Polymere, die in situ aushärten, wirken oft toxisch auf die Zellen. Die US-Patentschrift 5,914,121 offenbart eine Zusammensetzung zur Implantation in ein Säugetier umfassend Fibroblasten, Hydroxylapatit-Pulver und Fibrin. Diese Zusammensetzung weist keine Sekundärstabilität auf, weil sich das Material nach Implantation nicht verfestigt, sondern weiter verformbar ist. Grund dafür ist, daß keramisches Hydroxylapatit-Pulver verwendet wird. Diese Zusammensetzung härtet nicht aus, da die Partikel keine Verbindung untereinander eingehen. Im Stand der Technik gibt es kein Knochenersatzmaterial, das lebende Zellen enthält und somit osteogen wirken kann und zugleich ausreichende Sekundärstabilität bereitstellt.

Es besteht also ein dringendes Bedürfnis nach einem vorteilhaften Knochenersatzmaterial.

Die Aufgabe wurde gelöst durch das erfindungsgemäße Knochenersatzmaterial, das eine weiche Matrix, lebende Zellen und eine aushärtende Matrix umfaßt. Für das erfindungsgemäße Knochenersatzmaterial wurde eigens eine geeignete Misch- und Applikationseinheit entwickelt.

Das erfindungsgemäße Knochenersatzmaterial weist eine hervorragende Primär- und die Sekundärstabilität auf. Unter der Primärstabilität (auch "primäre Plastizität") eines Knochenersatzmaterials wird die Stabilität einer Zusammensetzung zum Zeitpunkt der Applikation verstanden. Das Knochenersatzmaterial der vorliegenden Erfindung ist plastisch verformbar und kann in konkrete dreidimensionale Formen gebracht werden, je nach den anatomischen Erfordernissen. Das Material ist also nicht zu "flüssig", da sich dann keine plastischen Gebilde würden formen lassen. Es ist aber auch nicht zu starr, im Extremfall sogar völlig erhärtet, da es dann nicht den Gegebenheiten des Falles einfach angepaßt

werden könnte und da derartige "harte" Implantate in der Regel keine osteogenen Komponenten enthalten könnten. Unter Sekundärstabilität ist die Stabilität des Implantats nach dem Eingriff zu verstehen. Das Knochenersatzmaterial der Erfindung behält nach dem Aushärten langfristig die dreidimensionale Form, die ihm verliehen wurde. Es ist druckstabil. Dies wird dadurch erreicht, daß das erfindungsgemäße Material, das zuvor entsprechend geformt worden ist, in relativ kurzer Zeit vollständig aushärtet.

Die weiche Matrix gewährleistet das Überleben der Zellen, ihre Migration und Organisation in der Matrix und ihre Differenzierung zu knochenbildenden Osteoblasten. Eine weitere Funktion der weichen Matrix ist, daß sie zur Primärstabilität des Materials, also zur anfänglichen Formbarkeit, beiträgt. Die weiche Matrix ist vorzugsweise eine Fibrinsuspension, bevorzugter eine autogene oder allogene Fibrinsuspension, die aus einer Fibrinogenlösung hergestellt werden kann. Dies wird vorzugsweise durch Zugabe einer Thrombin-haltigen Lösung, bevorzugter einer auto- oder allogenen Thrombin-haltigen Lösung in Gegenwart von Calcium erreicht. Vor Zugabe des Thrombins kann die Fibrinogenlösung zur Stabilisierung des später entstehenden Fibrins durch  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, Aprotinin, Faktor 13 oder ähnliche Substanzen angereichert werden. Die weiche Matrix kann gegebenenfalls angereichert sein mit Chondroitinsulfat, Proteoglykanen, Sialoproteinen, Hormonen oder Wachstumsfaktoren. Beispiele für Wachstumsfaktoren, die zum Einsatz kommen können, sind bFGF, PDGF, VEGF, Bone Morphogenetic Proteins, TGF- $\beta$  und weitere bekannte Faktoren. Nucleinsäuren, die die Wachstumsfaktoren oder Hormone kodieren, können ebenfalls in der weichen Matrix enthalten sein, vorzugsweise in Form von Plasmiden. Ergänzend können weitere visköse, gelierende und sich verfestigende Gele verwendet werden, wie zum Beispiel biologische Kollagengele, Gelatine, Alginate, Agarose, Polysaccharide, synthetisches Kollagen, Hydrogele oder visköse Polymere. Es können auch kommerzielle Fibrinkleber wie TissuCol® (Baxter) oder

Beriplast (Aventis) eingesetzt werden, sie sind aber nicht bevorzugt.

Bei den lebenden Zellen des erfindungsgemäßen Knochenersatzmaterials handelt es sich vorzugsweise um Osteoblasten oder Vorläuferzellen von Osteoblasten. Diese können durch kleine Knochenbiopsien des Beckens, Brustbeins, des Schädels oder Kiefers oder von Röhrenknochen gewonnen werden. Alternativ zu Knochenproben können auch Aspirate von Knochenmark aus dem Becken und aus dem Brustbein verwendet werden. Gegebenenfalls können die gewonnenen Zellen in vitro kultiviert und vermehrt werden. Vorteilhafterweise enthält das Knochenersatzmaterial auch gefäßbildende Zellen, wie zum Beispiel Endothelzellen oder deren Vorläuferzellen.

Erfnungsgemäß handelt es sich bei den Zellen entweder um solche, die von dem Patienten selbst stammen (autologe Zellen) oder um Zellen bzw. Zelllinien, die von dem Empfänger toleriert werden. Beispiele hierfür sind embryonale Stammzellen sowie allogene mesenchymale Stammzellen, Fibroblasten, stromale Zellen oder Osteoblasten, Endothelzellen, Muskelzellen, bzw. deren Vorläuferzellen. Ebenfalls können autogene mesenchymale Stammzellen, Fibroblasten, stromale Zellen oder Osteoblasten, Endothelzellen, Muskelzellen, bzw. deren Vorläuferzellen verwendet werden.

Das erfindungsgemäße Material umfaßt auch eine erhärtende Matrix. Dadurch verfestigt sich das Material innerhalb einer bestimmten Zeit zu einer stabilen Zusammensetzung. Bevorzugt verfestigt sich die Zusammensetzung innerhalb einer Stunde, am bevorzugtesten innerhalb von 15 Minuten. Das Knochenersatzmaterial weist eine pastöse Konsistenz auf, wodurch die Primärstabilität bereitgestellt wird. Dies bedeutet, daß das Material leicht an eine bestimmte Form angepaßt oder in eine bestimmte Form gebracht werden kann. Die Primärstabilität wird vorteilhafterweise durch die in der Zusammensetzung enthaltenen Fibrinstränge bereitgestellt. Die erhärtende Matrix ist für die Sekundärstabilität

verantwortlich. Das bedeutet, daß die Zusammensetzung nach dem Erhärten nicht mehr verformbar ist, sondern Druckfestigkeit aufweist.

Vorzugsweise verbindet sich die erhärtende Matrix durch Kristallisation zu Hydroxylapatit. Die feste Matrix kann durch anorganische Verbindungen z.B. aus kristallinen oder amorphen Calciumphosphaten (Tetracalciumphosphat,  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Tricalciumphosphat, Dicalciumphosphat oder Dicalciumphosphatdihydrat) hergestellt werden. Vorzugsweise finden fertige sog. nicht-keramische Knochenzemente aus Kombinationen dieser Calciumphosphatverbindungen Anwendung (z.B. BoneSource®, Fa. Leibinger; Norian SRS®, Fa. Synthes-Stratec, USA; Biobone®, Fa. Merck, Darmstadt). Diese zeichnen sich dadurch aus, daß sie eine röntgenspektrometrische Diffraction ähnlich dem der mineralischen Phase des Knochens haben, sich endothermal oder isothermal bei Körpertemperatur von 37°C in 10-15 Minuten zu mikroporösem Calciumphosphatzement durch Kristallisation verbinden, injizierbar sind, eine Druckstabilität (ca. 60 Mpa) größer oder gleich der von normalem Knochen aufweisen, chemische Verbindungen zum Empfängerknochen eingehen und als osteokonduktive Leitschiene fungieren können.

Calciumphosphatzement wird *in vivo* langsam resorbiert (ca. 35% in der ersten 12 Monaten). Das bevorzugteste Material der sich erhärtenden Matrix ist nicht-keramischer Hydroxylapatit-Zement. Einige Eigenschaften von Hydroxylapatit-Zement sind in Costantino P. D. et al. (1991) Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery 117, 379 angegeben. Hydroxylapatit-Zement weist wesentliche Unterschiede zu sogenanntem keramischem Hydroxylapatit auf, welcher häufig in der klinischen Praxis verwendet wird. Hydroxylapatit-Zement verbindet sich erst durch direkte Kristallisation zu Hydroxylapatit. Die Bestandteile von Hydroxylapatit-Zement reagieren in wässriger Umgebung zu Hydroxylapatit. Unter *in vitro*-Bedingungen bei 37° bindet reiner Hydroxylapatit-

Zement in etwa 15 Minuten ab. Hydroxylapatit-Zement im Sinne dieser Anmeldung ist ein Calciumphosphat-Zement, der sich durch einen Kristallisationsprozeß zu Hydroxylapatit verbindet.

Um die Spritzbarkeit bzw. die mechanischen Eigenschaften zu verändern, können den Calciumphosphaten weitere Verbindungen zugegeben werden, wie z. B. Natriumchlorid-Lösung, Milchsäure, Glycerol, Chitosan, Natriumglycerolphosphat, Propylenfumarat oder bioaktive Proteine.

Auch andere Materialien, wie Poly-Glykol-Milchsäure (Poly-glycolic-lactid-acid, PGLA), können ebenfalls eingesetzt werden.

Die vorliegende Erfindung stellt damit ein spritzbares Knochenersatzmaterial zur Verfügung, das lebende Zellen enthält, bevor es verabreicht wird. Dies unterscheidet den Gegenstand der Erfindung von Knochenersatzmaterialien, die keine Zellen enthalten, sondern erst nach Implantation von Zellen besiedelt werden können. Derartige Materialien, die meist nicht formbar sind und/oder nicht aushärten, können allenfalls osteokonduktiv wirken, d.h. als Leitschiene zur Einsprössung von Knochengewebe. Im Gegensatz dazu wirkt das erfindungsgemäße Knochenersatzmaterial osteogen, d.h. es führt zur Bildung von Knochengewebe aus sich heraus.

Das Knochenersatzmaterial der vorliegenden Erfindung wird in applizierbarer Form, vorzugsweise in spritzbarer Form, zur Verfügung gestellt.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Knochenersatzmaterials, das die folgenden Merkmale umfaßt:

- a) Bereitstellung von lebenden Zellen,

miteinander gemischt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden die Komponenten unter GMP-Bedingungen in einer Mehrfachspritze bereitgestellt. Dem Anwender steht dann eine zur Injektion/Implantation fertige Apparatur und Masse zur Verfügung, die unter dem Spritzvorgang gemischt wird und damit den Abbindevorgang des Fibrinogens zu Fibrin und des Zementpulvers zu festem Knochenzement einleitet.

Beispielsweise kann in einer Doppelspritze mit einem Mündungsstück eine Spritze mit Calciumphosphatzementpulver in einer Calciumchloridlösung mit Thrombin aufgezogen werden. In der anderen Spritze wird Fibrinogenlösung mit suspendierten Osteoblasten (bevorzugt  $1 \times 10^5$  bis  $5 \times 10^6/\text{ml}$ ) aufgezogen. In getrenntem Zustand sind die Komponenten ca. 10-15 Minuten haltbar. Durch Spritzen und Zusammenführen der beiden Komponenten in einem gemeinsamen Mündungsstück verbindet sich das Fibrinogen durch Thrombin in Anwesenheit von Calciumionen zu Fibrin. Der Calciumphosphatzement verfestigt sich innerhalb von 15-30 Minuten. Dabei ist zu gewährleisten, daß die Komponenten in einer bestimmten Weise unter Ausbildung von Mikrostrukturen wie beispielsweise interkonnektierenden Poren mit 100 bis 800  $\mu\text{m}$  Porengröße, gemischt werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird eine Dreifachspritze verwendet, die folgende Kompartimente enthält:

1. Die zentrale Spritze enthält eine wässrige Calciumphosphatzementlösung, gegebenenfalls mit folgenden Ergänzungen: Natriumchloridlösung, Milchsäure, Glycerol, Chitosan, Natriumglycerolphosphat, Propylenfumarat, bioaktive Proteine wie Thrombin, Wachstumsfaktoren, Hormone und/oder dafür kodierende Gene in geeigneten Vektoren.
2. Die seitliche Spritze 1 enthält eine Calciumchlorid-Thrombinlösung, gegebenenfalls mit folgenden Zusätzen:

Chondroitinsulfat, Proteoglykane, Sialoproteine, Polysaccharide und/oder Wachstumsfaktoren.

3. Die seitliche Spritze 2 enthält eine Fibrinogenlösung und suspendierte Osteoblasten mit gegebenenfalls  $\epsilon$ -Aminocapronsäure.

Vorzugsweise kann auch eine Komplettspritze mit drei Kammern zur Anwendung kommen, wie sie in Figur 1 gezeigt ist. Durch synchrones Spritzen wird um einen Calciumphosphatzement-Strahl von 500-2500  $\mu\text{m}$  Durchmesser eine Osteoblasten-Fibrinmatrix gelegt, die in dreidimensionaler Form spongiösem Knochen entspricht.

Dem Fachmann ist klar, daß die Zusammensetzung auch in einer herkömmlichen Einkammer-Spritze appliziert werden kann, nachdem sie vorher aus den verschiedenen Lösungen bzw. Suspensionen durch Mischen hergestellt worden ist. Jedoch ist die separate Mischung der Einzelkomponenten im praktischen Einsatz im OP problematisch, da sich bei eventuellen Verzögerungen in der Anwendung die durchmischten und somit aktivierten Komponenten unweigerlich verfestigen und somit keine optimale Flexibilität in der Anwendung gewährleistet ist.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist eine Vorrichtung, mit der das spritzbare Knochenmaterial der vorliegenden Erfindung appliziert werden kann. Die Erfindung betrifft daher eine Vorrichtung zur Zubereitung und Verabreichung eines Gemisches umfassend eine Mischkammer mit einer Auslaßöffnung, durch die das Gemisch austreten kann, einen in die Mischkammer führenden ersten Zuleitungskanal (Hauptkanal) und einen oder mehrere in die Mischkammer führende weitere Zuleitungskanäle (Nebenkanäle), wobei das Ende des Nebenkanals bzw. die Enden der Nebenkanäle in der Mischkammer so angeordnet sind, daß aus dem Nebenkanal/den Nebenkanälen in die Mischkammer

eintretendes Material in den aus dem Hauptkanal in die Mischkammer eintretenden Materialstrom eindringen kann.

Vorzugsweise hat der Hauptkanal einen Innendurchmesser von mehr als 1 mm, bevorzugter von mehr als 1,5 mm. Durch diesen Zuleitungskanal kann visköses oder hochvisköses Material in die Mischkammer eingebracht werden. Aufgrund des relativ hohen Durchmessers des Hauptkanals können auch lebende Zellen, die in eine visköse Matrix eingebettet sind, in die Mischkammer zugeführt werden, es treten nur sehr niedrige Scherkräfte auf. Vorzugsweise befindet sich die Öffnung des Hauptkanals im Zentrum einer Wand der Mischkammer.

Der Nebenkanal/die Nebenkanäle haben vorzugsweise einen Innendurchmesser von höchstens 1,5 mm und dienen in der Regel der Zuführung niedrigvisköser Materialien in die Mischkammer. Der bevorzugteste Innendurchmesser ist 0,1 bis 1 mm. Die Nebenkanäle können beispielsweise Hohlkanülen mit einem Außendurchmesser von 0,4 bis 1,5 mm sein. Die Anzahl der Nebenkanäle ist wenigstens 1, die bevorzugte Anzahl ist 3 bis 5. Durch die verschiedenen Nebenkanäle kann jeweils das gleiche Material zugeführt werden, es ist aber auch möglich, daß verschiedene Materialien durch die einzelnen Nebenkanäle zugeführt werden. Die Öffnungen des Nebenkanals/der Nebenkanäle in der Mischkammer sind so angeordnet, daß Material, das aus dem Nebenkanal/den Nebenkanälen in die Mischkammer eintritt, in Material, das aus dem Hauptkanal in die Mischkammer eintritt, eindringen kann. Die Öffnungen der Nebenkanäle sind vorzugsweise symmetrisch um die Öffnung des Hauptkanals in der Mischkammer herum angeordnet, so daß aus ihnen austretendes Material in den zentralen Materialstrom, der aus dem Hauptkanal austritt, injiziert wird. Durch diese Injektion findet eine sehr vorteilhafte Durchmischung der niedrigviskösen Komponenten mit der höherviskösen Komponente statt. Dadurch kann beispielsweise direkt während der Anwendung eine reproduzierbare Durchmischung und innige Verbindung der Einzelkomponenten stattfinden. Dabei können Gemische mit interkonnektierenden Strukturen mit einer

Porengröße von 100-800 µm erhalten werden. Bislang waren zur Durchmischung von Komponenten stark unterschiedlicher Viskosität wesentlich komplexere Mischvorrichtungen nötig.

Vorzugsweise wird durch den Hauptkanal eine hochviskose Calciumphosphat-Mischung zugeführt. In einem Nebenkanal kann dann beispielsweise eine Suspension umfassend Fibrinogen und lebende Zellen zugeführt werden. In weiteren Nebenkanälen können zusätzliche Materialien, Zellen wie zum Beispiel Endothelzellen oder weitere Faktoren zugeführt werden.

Ein wichtiger Vorteil der Vorrichtung ist, daß eine Mischung der Komponenten derart erreicht wird, daß eine bevorzugte Mikrostruktur des Materials entsteht, die sich durch Porosität, Interkonnektion der Poren und ein Gerüst, vorzugsweise aus Hydroxylapatit, das ausreichend stabil ist, auszeichnet.

Ein weiterer Vorteil der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist, daß sie so ausgebildet sein kann, daß aufgrund eines sehr geringen Totvolumens nur wenig Material in der Vorrichtung zurückbleibt. Dies kann ein wesentlicher Faktor sein, wenn teure oder schwer ersetzbare Materialien (Zellen) appliziert werden.

In einer besonderen Ausführungsform sind mit den Zuleitungen Vorratsbehältnisse verbunden, aus denen der Inhalt der Vorratsgefäße in die Zuleitungskanäle abgegeben werden kann. Vorzugsweise handelt es sich bei den Vorratsbehältnissen um Spritzen. Das hat den Vorteil, daß medizinisch genormte, sterile Einwegspritzen (Luer-System) verschiedener Größe verwendet werden können. Die Spritzen können in spezielle genormte Anschlüsse gesteckt werden, die an den Enden der Zuleitungskanäle angebracht sind. Die Vorrichtung kann weiter eine Halterung für die Spritzen umfassen sowie eine Stempelinrichtung, mit der mehrere Stempel der verschiedenen Spritzen gleichzeitig zur Entleerung der Spritzen gedrückt werden können. Die Spritzen, die Halterung und die

Anschließend wird 60 µl der Calciumchlorid-Thrombin-Lösung aus Beispiel 2 zugegeben. Das Gemisch wird in eine Kulturschale oder in die Vertiefungen einer 48-Well-Platte gespritzt. Nach Zugabe von 760 µl Kulturmedium BGJ-B mit 10% FCS und 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin werden die Zellen im Wärmeschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Im Lichtmikroskop zeigt sich nach 24 bis 72 Stunden bei 100-facher Vergrößerung die Ausbildung des osteoblastischen Phänotyps mit dendritischen Zellausläufern und nach 5 bis 12 Tagen der Aufbau von interzellulären Verbindungen der Zellen. Im Verlauf bilden die Zellen eine extrazelluläre Matrix um sich, die später mineralisiert wird. Die Vitalität der Zellen kann durch Trypanblaufärbung überprüft werden. Dazu wird der Überstand an Kulturmedium abgesaugt, anschließend werden 50 µl Trypanblaulösung zugegeben. Die Zellen werden dann unter dem Lichtmikroskop untersucht. Bei Trypanblaufärbung finden sich auch nach Wochen nur wenige abgestorbene Zellen.

#### Beispiel 4

##### Herstellung einer Hydroxylapatit-Osteoblastenmischung

Osteoblasten wurden in Medium suspendiert und auf nicht-keramisches Hydroxylapatit gegeben, welches aus Calciumphosphat hergestellt wurde. In der Kultur hafteten die Zellen an den Hydroxylapatit-Partikeln. Im Elektronenmikroskop zeigte sich eine Adhäsion der Zellen auf der kristallinen Oberfläche. Im Stoffwechseltest zeigte sich ein erhaltener Zellmetabolismus der anhaftenden Zellen.

#### Beispiel 5

##### Herstellung einer Hydroxylapatit-Zement-Fibrin-Matrix

Als fester Bestandteil wurde der Fibrin-Suspension ein Zement aus Calciumphosphat zugegeben. Dazu wurde zunächst untersucht,

ob der in Wasser gelöste Zement sich mit dem Fibrin/Thrombin/Calciumchlorid-Komplex vermischen und als Paste spritzen läßt. Es gelang, die Mischung zu spritzen und sie anschließend zu formen (Primäre Stabilität). Sie behielt die gegebene Form und verfestigte sich in Minuten zu einer festen Substanz (Sekundäre Stabilität).

#### Beispiel 6

##### Herstellung einer Osteoblasten-Fibrin-Calciumphosphat-Zement-Paste

###### a) Fibrinogenlösung:

66 mg Fibrinogen werden in 1 ml Kulturmedium ( $\alpha$ MEM oder Medium 199 oder BGJ-B-Medium) ohne Serumzusatz mit 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin oder physiologischer Kochsalzlösung gelöst.  $\epsilon$ -Amino-n-capronsäure wird in einer Endkonzentration von 0,1 bis 10% der Fibrinogenlösung zugesetzt.

###### b) Fibrinogen-Osteoblastensuspension:

Die Zellkultur wird etabliert, wie in Beispiel 1 beschrieben. Die subkonfluente Zellkultur wird trypsinisiert, in Medium suspendiert und zentrifugiert (siehe Beispiel 3). Das Zellpellet wird in 100  $\mu$ l Medium resuspendiert. Nach Zellzählung werden 20.000 Osteoblasten (Zellpassage 1 bis 3) in 200  $\mu$ l Fibrinogenlösung suspendiert.

###### c) Calciumphosphat-Thrombin-Calciumchloridlösung:

1,25 I.E. Thrombin werden in 0,5 ml 40 mM Calciumchloridlösung gelöst. Anschließend wird 1 g Calciumphosphat-Pulver (BoneSource<sup>®</sup>) zu 0,5 ml der Calciumchlorid-Thrombin-Lösung zugegeben.

## d) Mischung der Komponenten:

500 µl Fibrinogen-Osteoblasten-Suspension und 500 µl Calciumphosphat-Thrombin-Calciumchlorid-Lösung werden in eine 1 ml Spritze eingebracht. Die Spritze wird dann etwa 10 Sekunden geschüttelt, wonach jeweils etwa 200 µl in eine Kulturschale oder 48-Well-Platte gespritzt werden. Danach wird 800 µl Kulturmedium BGJ-B mit 10% FCS und 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin zugegeben. Die Zellen werden, wie oben beschrieben, im Wärmeschrank inkubiert.

## e) Stoffwechseltest MTS (Cell Proliferation Assay):

Der Cell Proliferation Assay der Firma Boehringer Mannheim wurde benutzt. Er beruht auf der Transformation eines Tetrazoliumsalzes MTS zu einem gelbgefärbten Formazan durch die mitochondriale Dehydrogenase. Es handelt sich um einen kalorimetrischen Stoffwechseltest. Die Ansätze beinhalteten 20.000 menschliche Osteoblasten (hOB) pro Ansatz (48-Well), 200 µl Fibrinogenlösung (66 mg/ml) und 200 µg Calciumphosphatpulver (CaP) in 200 µl Calciumchlorid-Thrombin-Lösung. Nach Absaugen des Kulturmediums wurde 1 ml MTS-Lösung zugegeben. Der Farbumschlag in jeweils 100 µl MTS-Lösung wurde nach drei Stunden photometrisch bestimmt. Die verschiedenen Ansätze und Kontrollen sind in der folgenden Tabelle I wiedergegeben:

Ansatz	hOB	hOB-Fibrin	Injizierbarer Knochen	hOB-Fibrin OFS	hOB-CaP	Fibrin	CaP
		getrennt	gemischt	gemischt	gemischt		
	1	2	3	4	5	6	7
20.000 hOB	x	x	x	x	x		
200 µl Fibrinogen		x	x	x		x	
200 µg CaP			x		x		x

in einen Mehrkomponentenapplikator, bestehend aus mehreren Containern, die auch Spritzen sein können, die kombiniert sind, oder

in eine Komplettspritze mit mehreren Kammern gegeben wird.

27. Verwendung von nicht-keramischem Hydroxylapatit-Zement zur Herstellung eines Zellen enthaltenden Knochenersatzmaterials.

28. Vorrichtung zur Zubereitung und Verabreichung eines Gemisches umfassend

- a) eine Mischkammer mit einer Auslaßöffnung, durch die das Gemisch austreten kann,
- b) einen in die Mischkammer führenden ersten Zuleitungskanal (Hauptkanal) und
- c) einen oder mehrere in die Mischkammer führende weitere Zuleitungskanäle (Nebenkanäle),

wobei das Ende des Nebenkanals/die Enden der Nebenkanäle in der Mischkammer so angeordnet sind, daß aus dem Nebenkanal/den Nebenkanälen in die Mischkammer eintretendes Material in den aus dem Hauptkanal in die Mischkammer eintretenden Materialstrom eindringen kann.

29. Vorrichtung nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß der Innendurchmesser des Hauptkanals wenigstens 1 mm beträgt.

30. Vorrichtung nach Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß der Innendurchmesser des Nebenkanals/der Nebenkanäle höchstens 1,5 mm beträgt.

31. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 28 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß sie 3 bis 5 Nebenkanäle umfaßt.

32. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 28 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß die Enden der Nebenkanäle in der Mischkammer im wesentlichen symmetrisch um das Ende des Hauptkanals in der Mischkammer herum angeordnet sind.

33. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 28 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß sich das Ende des Nebenkanals/die Enden der Nebenkanäle in der Mischkammer mit der gedachten Verlängerung des Hauptkanals in der Mischkammer überschneiden.

34. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 28 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß mit den Zuleitungskanälen Vorratsbehältnisse verbunden sind, aus denen der Inhalt der Vorratsbehältnisse in die Zuleitungskanäle abgegeben werden kann.

35. Vorrichtung nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorratsbehältnisse Spritzen sind.

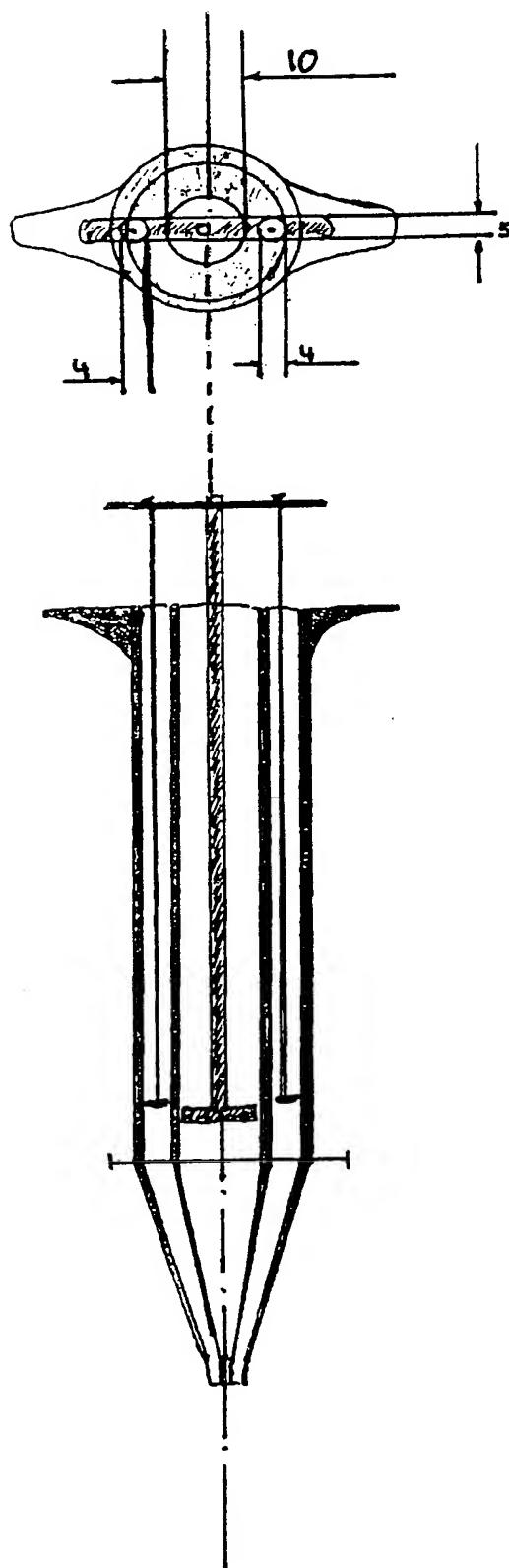
36. Knochenmaterial nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß es in einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 28 bis 35 bereitgestellt wird.

37. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß das Knochenersatzmaterial in einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 28 bis 35 hergestellt wird.

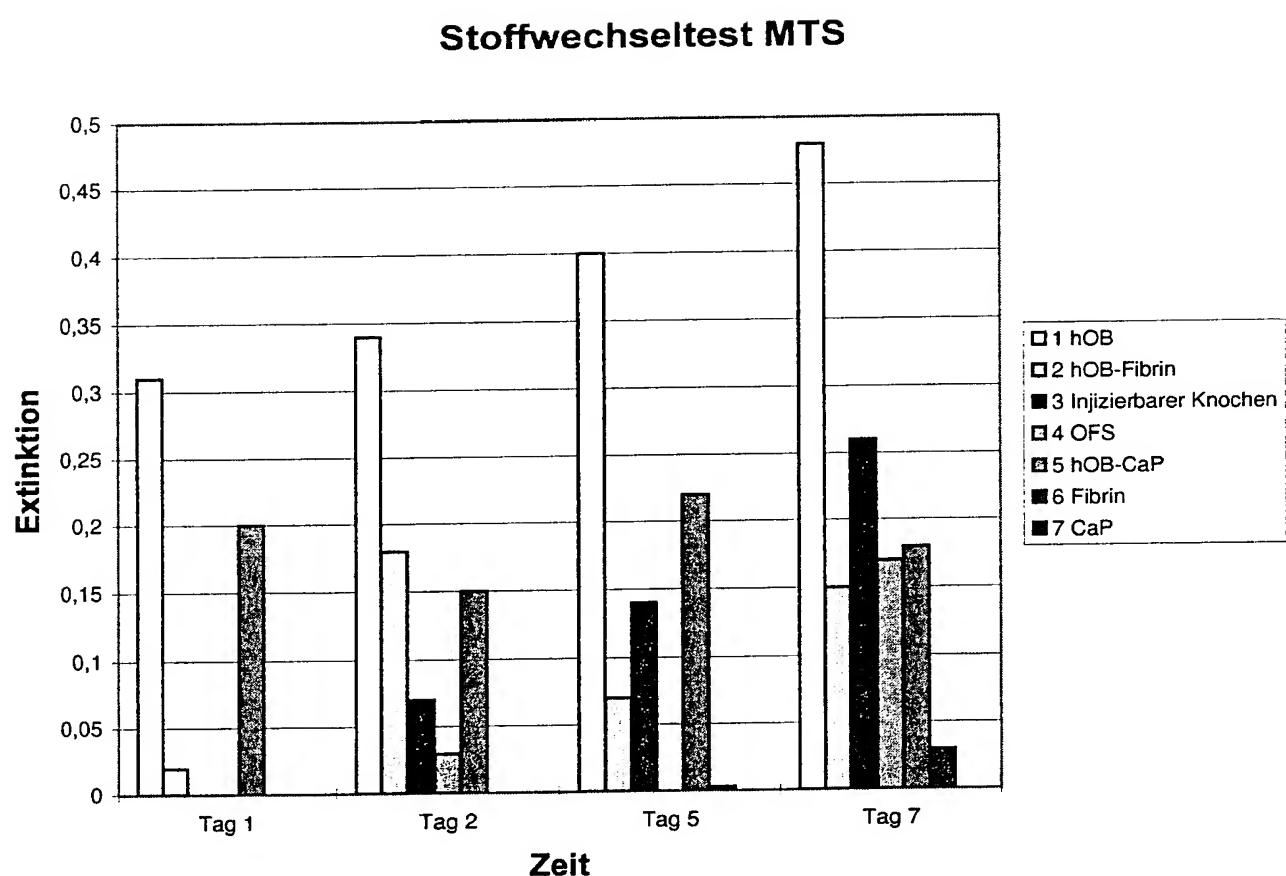
1/5

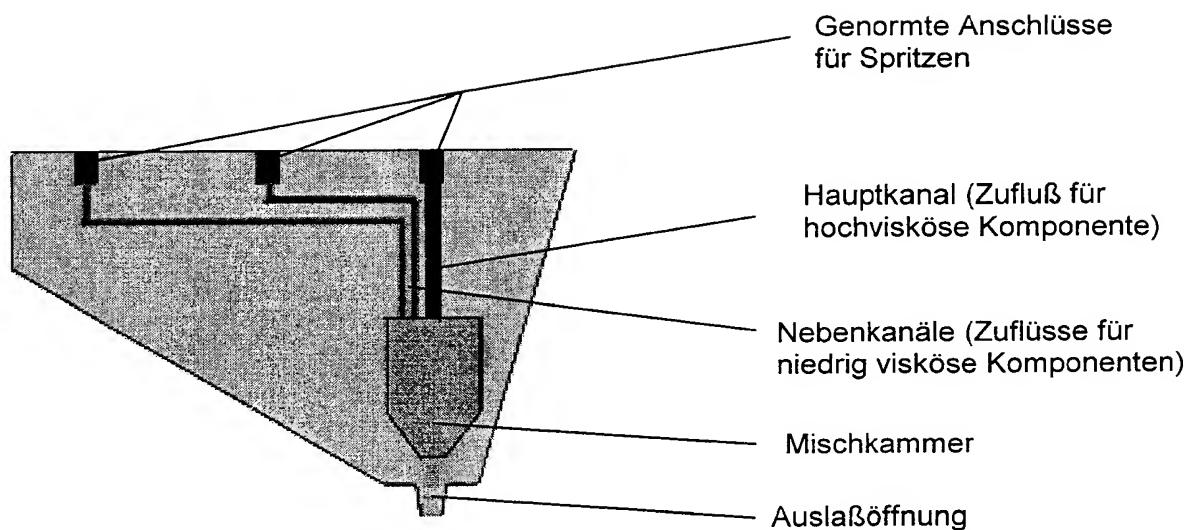
Figur 1

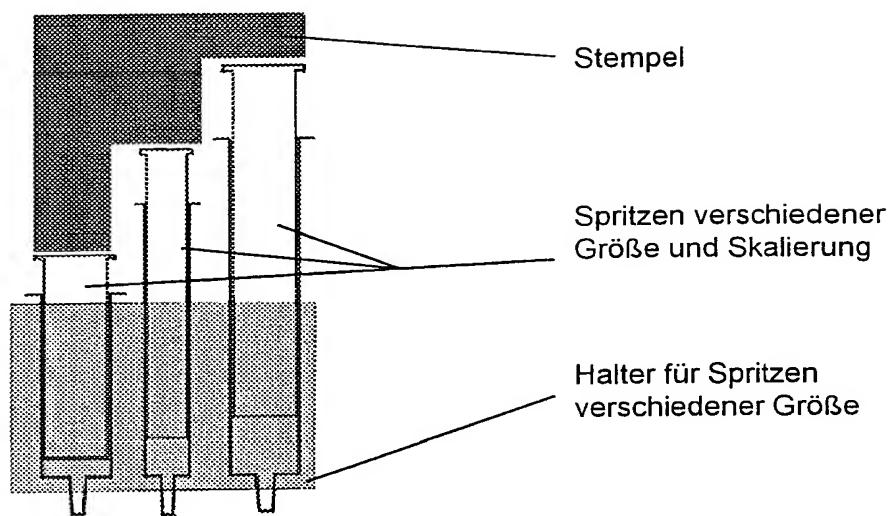
Fertigspritze mit 3 Kammern



Figur 2



**Figur 3****Mischvorrichtung**

**Figur 4****Halter für Injektionssysteme**

**Figur 5**